

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平7-506245

第1部門第1区分

(43)公表日 平成7年(1995)7月13日

(51)Int.Cl.\*  
C 12 Q 1/68  
C 12 N 15/09

識別記号 庁内整理番号  
Z N A Z 9453-4B

F I

9281-4B

C 12 N 15/00

A

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全13頁)

(21)出願番号 特願平5-513403  
(86) (22)出願日 平成5年(1993)1月27日  
(85)翻訳文提出日 平成6年(1994)7月27日  
(86)国際出願番号 PCT/US93/00721  
(87)国際公開番号 WO93/15225  
(87)国際公開日 平成5年(1993)8月5日  
(31)優先権主張番号 827, 691  
(32)優先日 1992年1月28日  
(33)優先権主張国 米国(US)  
(81)指定国 E P (A T, B E, C H, D E,  
D K, E S, F R, G B, G R, I E, I T, L U, M  
C, N L, P T, S E), C A, F I, J P, K R, N  
O

(71)出願人 ノース・ショアー・ユニバーシティー・ホ  
スピタル・リサーチ・コーポレーション  
アメリカ合衆国、ニューヨーク州 11030、  
マンハセット、コミュニティ・ドライブ  
350  
(72)発明者 ベルゴリッティ、ロバート・ジー  
アメリカ合衆国、ニュージャージー州  
07646、ニュー・ミルフォード、ニューブ  
リッジ・ロード 375  
(72)発明者 アースター、スザン・エイチ  
アメリカ合衆国、ニューヨーク州 11733、  
セタウケット、キャンパス・ドライブ 1  
(74)代理人 弁理士 鈴江 武彦 (外3名)  
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 脆弱X染色体PCR

(57)【要約】

核酸または核酸混合物中に含まれる特定のGCリッチ配列を增幅し、測定するための方法が提供される。この方法は、前記特定の配列を含む分離された核酸を、過剰モルのプライマー及びポリメラーゼで処理することと、dATP, dCTP, TTPおよびdTTP類縁体の存在下に前記プライマーを伸長させることとを具備する。本発明の一つの応用においては、脆弱X症候群のキャリアであるか又は患者である個体が検出される。

特表平7-506245 (2)

ゲノムDNA, 50 pmol の各オリゴヌクレオチドプライマー、2.5 単位のTaq ポリメラーゼ及び10% DMSO を添加する工程を具備した方法。

6. 請求項1に記載の方法であって、DNAからなる群から選択される前記核酸がcDNAである方法。

7. 請求項1に記載の方法であって、前記プライマーが、少なくとも約1000:1 (プライマー: 相補鎖) のモル比で存在する方法。

8. 請求項1に記載の方法であって、更に、

(a) 増幅された核酸のサイズを測定する工程と、

(b) 前記測定の結果を標準と比較し、増幅された核酸が脆弱X 遺伝子欠損に関連した構造に対応するか否かを確認する工程とを具備する方法。

9. 請求項1に記載の方法であって、更に、前記選択されたGCリッチ配列を、複数のCGG繰り返し配列を有する核酸配列にハイブリダイズさせる工程を具備した方法。

10. 個体が脆弱Xのゲノムを有するか否かの測定に用いるキットであって、

(a) FMR-1配列内にある配列、X染色体中のFMR-1配列の近傍にある配列、FMR-1配列にハイブリダイズできる少なくとも約10ヌクレオチドの配列、X染色体中のFMR-1配列の近傍にある配列にハイブリダイズできる少なくとも約10ヌクレオチドの配列、およびこれらの組み合わせからなる群から選択されるオリゴヌクレオチドプライマーと、

請求の範囲

1. 個体が正常であるか、または脆弱Xのキャリア若しくは患者であるかを確認する方法であって、

個体から得られた核酸サンプルを、プライマーを用い、GTP およびdGTP からなる群の構成員の類縁体を用いて、ポリメラーゼ・チエイン・リアクションにより増幅する工程を具備し、

前記核酸サンプルはDNA、RNA およびこれらの組み合わせから選択され、

前記プライマーは、FMR-1配列内にある配列、FMR-1配列の近傍にある配列、FMR-1配列にハイブリダイズできる少なくとも約10ヌクレオチドの配列、FMR-1配列の近傍にある配列にハイブリダイズできる少なくとも約10ヌクレオチドの配列、およびこれらの組み合わせからなるオリゴヌクレオチド群から選択される方法。

2. 請求項1に記載の方法であって、少なくとも5サイクルのPCRを具備する方法。

3. 請求項1に記載の方法であって、前記PCR反応混合物が実質的にGTPを含まない方法。

4. 請求項2に記載の方法であって、更に、7-デアザ-2'-GTPの使用を含む方法。

5. 請求項2に記載の方法であって、更に、50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.001% (w/v) ゼラチンを含有する緩衝液中に前記トリホスフェート及びプライマーを分散させると共に、0.5-1 μg の変性

(b) GTP およびdGTP からなる群の構成員の類縁体とを具備したキット。

11. 請求項10に記載のキットであって、前記GTP およびdGTP からなる群の構成員の類縁体が、実質的に7-デアザ-2'-GPTからなるキット。

12. 請求項11に記載のキットであって、更に、FMR-1にハイブリダイズできるプローブを具備するキット。

13. 請求項12に記載のキットであって、前記プローブがラベルを含むキット。

14. 請求項11に記載のキットであって、更に、実質的に複数の5' [CGG] 3' 繰り返し単位からなるプローブを具備するキット。

15. 請求項14に記載のキットであって、前記プローブがラベルを含むキット。

16. 個体が脆弱X症候群を有しているか否かを決定する方法であって、

(a) 前記個体からゲノムDNAサンプルを得る工程と、  
(b) 1) FMR-1に存在するオリゴヌクレオチド、2)

FMR-1に隣接するオリゴヌクレオチド、3) FMR-1に存在し且つこれに隣接するオリゴヌクレオチド、および(1)これらとの組み合わせからなる群から選択されるプライマーを、前記FMR-1遺伝子配列のGCリッチ領域を増幅するのに有効な方法で使用して、前記DNAサンプルを増幅する工程と、

(c) 前記増幅産物を分析し、塩基対の数を確認する工

程と、

(d) 前記分析の結果を標準と比較する工程とを具備した方法。

明細書  
脆弱X染色体PCR

〔発明の分野〕

本発明は、一般的には核酸配列の増幅、検出およびクローニングの方法に関し、試験サンプル中に特殊な核酸配列が存在するか否かを見きわめるために使うこともできる。より明確に言うと、本発明は選択されたGCリッチな核酸配列を増幅し、該配列の検出および/またはクローニングを容易にするプロセスに関するものである。一般様において、本発明のプロセスでは、テンプレートに結合したプライマーの伸長を触媒するために耐熱性のポリメラーゼを用いている。本発明はまた、遺伝的または突発的な遺伝子欠損を検出する診断用試験の開発に関するものである。本発明の1つの応用によって、保因者、患者、妊娠3ヶ月以降の胎児、妊娠8週目までの胎児について、脆弱X染色体症候群(fragile X syndrome)を引き起こす遺伝子欠損の分析が提供される。

〔発明の背景〕

脆弱X染色体症候群(以下、脆弱Xという)は、精神障害または発育上の疾患に関する最も一般的な遺伝的形態である。この症状の発症率は、男性では約1250人に1人、女性では約

特表平7-506245 (3)

2000人に1人である。その名前が意味しているように、脆弱Xは、X染色体に関連した症状である。この脆弱Xの表現型は、X染色体の末端近傍の、q27.3座における明かな収縮により特徴づけられ、組織培養のある条件下においてX染色体のチップ(lip)が破断する傾向がある。これらの組織培養の操作手順は、現在、脆弱Xのために用いられている最も一般的な試験の基礎を形成している。

この症状の遺伝パターンは、X染色体に関連した症状に付随する遺伝パターンとして典型的ではない。典型的には、X染色体に関連した遺伝子欠損をもつ女性の息子は、50%の確率でこの欠損に悩まされる。また、異常遺伝子をもつ全男性は、典型的なパターンでX染色体に関連した症状に罹患する。更に、女性は2つのX染色体をもつので、通常は損傷を受けた1つのX染色体の影響を受けない。

しかしながら、脆弱Xにおいて、何人かのキャリア男性は表現型において正常である。更に、脆弱X染色体を遺伝的に受け継いだ女性の約1/3は、この病気に悩まされている。家族内の異なる世代において、キャリア男性の発病率は異なる。キャリアの男性の娘らは、一般に非発現型キャリアであるが、罹患した息子をもつかもしれない。更に、キャリアの父をもつ子供よりも、キャリアの母をもつ子供において、罹患した娘が一番高頻度で生じた(Brown, J. Inher. Genet. 47: 175-80, 1990)。

最近、研究者らはこの病気に関わるゲノム領域を同定した(Oberle et al., 「脆弱X症候群における550塩基対のD

NA切片における不安定性および異常なメチレーション」, Science 252: 1097-1102, 1991; Kremer et al., 「脆弱Xにおいてトリメクレオチド繰り返し配列p(CCG)nに至る不安定なDNAのマッピング」, Science 252: 1711-14, 1991; 及び Bell et al., 「脆弱Xハイバーメチレーションの全域にわたる物理的マッピングと、脆弱X症候群の臨床的発現」, Cell 64: 861-66, 1991)。更に、研究者達は、FMR-Iと呼ばれるこの領域由来の部分的なcDNAクローニングの配列を決定した(Verkerk et al., 「脆弱X症候群において長さが変化するブレークポイント・クラスター領域に対応した、繰り返しCCG配列を含む遺伝子(FMR-I)の同定」, Cell, 65: 905-14, 1991)。これら Oberle, Kremer, Bell および Verkerkの論文は、参照としてこの明細書に組み込まれる。

これらの研究によって、脆弱Xの遺伝パターンが典型的でないことにに関する解釈が与えられる。最終的に脆弱X表現型をもたらす突然変異は、段階的に生じる。初期の段階では、この遺伝子は完全に欠損しているわけではなく、むしろ該遺伝子は「プレミューテーション(prime-mutation)」の状態にある。このようなプレミューテーションの状態あるキャリアは、正常な表現型を有している。更なる突然変異は、子供に当該表現型を生じさせる女性のキャリアにおいて起きる。

FMR-Iをコードする配列は、多種の数のCCG繰り返し配列を含んでいる。キャリアでない個体は、そのFMR-I中に約30のCCG繰り返し配列を有する。しかし、キャ

リアは50から200ものCCG繰り返し配列を有する。このFMR-IのCCG繰り返し配列の増幅が、プレミューテーションである。罹患した個体はより多くのCCG繰り返し配列を有する。罹患した個体において、数千ほどのCCG繰り返し配列が観察された(Oberleら, 1991)。

しかしながら、罹患した個体の殆どは、FMR-I mRNAを発現しない(Oberle et al., 「脆弱X症候群におけるFMR-I遺伝子発現の欠如」, Cell 66: 1-20, 1991)。CCG繰り返し配列の数が約200コピーの閾値を超えると、CCG繰り返し領域の上流に位置するCpGアイランドがメチル化される(Oberle et al., 1991; Kremer et al., 1991; Bell et al., 1991)。このメチル化は、該遺伝子を不活性化する。

今まで、組織培養で細胞を生育させ、処理した後、患者のクロモソームを顕微鏡学的に検査することが、脆弱X症候群を診断する唯一の方法であった。その様な検査において、研究室ではX染色体を検査し、X染色体が特徴的に収縮されているのか、それとも破断チップを有しているのかを確かめていた。この方法は高価であり、信頼性も低い。例えばこの方法は、脆弱X症候群の男性キャリアの殆どと、女性キャリアの半分が見落とされる(「脆弱X症候群」, Oxford Univ. Press (Davies, ed. 1989))。脆弱Xのキャリアおよび遺伝子型を検出する別の方法では、サザーンプロットの方法論を用いる。しかし、この方法は感度および迅速性に欠ける欠点がある(Oberle et al., 「精神障害に関する脆弱X症候群

のDNA分析による直接的な診断法」、U. S. J. Med., 1673-81 (1991)。

本発明は、遺伝子欠損の分子構造に基づき、脆弱Xの遺伝子型をもつキャリアを確実に同定するための、迅速で且つ安価な遺伝学的試験を提供する。本発明の方法では、被検個体のX染色体におけるCGG繰り返し配列の数が、正常な人、キャリア及び患者の何れの特性を示しているかを決定する。

本発明の試験法は、ポリメラーゼ・チェーン・リアクション (polymerase chain reaction) に基づいています。PCRに基づく分析は、全DNA量に比べて低量しか存在しない特殊なDNA配列を検出するための理想的なものである。簡単に言えば、PCR法は特殊なDNA配列を、例えば100,000倍～1,000,000倍に増幅する。このレベルまで増幅されれば、特殊なDNA配列（もし存在するならば）は、容易に検出される。

ゲノムレベルでCGG繰り返し配列を直接同定するためのPCRに基づく方法を開発する以前の試みは、失敗に終わっているか（Ketner et al., 1991）、或いは部分的に成功したにすぎない（Fu et al., 「脆弱X部位におけるCGG繰り返し配列の変化は遺伝子の不安定性をもたらす：シャーマン・バラドックス（Sherman paradox）の解明」、Cell 67:1047-58 (1991)）。この領域は不安定であり、クローニングしたり、直接的に解析することは困難であるらしい。

GCリッチな配列を検出するためのPCRに基づく方法が有効でなかったため、別の病気に関する試験の開発が妨げら

#### 特許平7-506245 (4)

れた。例えば、エプスタイン-バール (Epstein-Barr) ウィルス感染、男性ホルモン受容体遺伝子、β-アドレナリン作用性受容体、あるいはCMVゲノムのクローニング (clonality) は、夫々、GCリッチな核酸配列によって特徴づけられる。従来のPCR法でエプスタイン-バール (Epstein-Barr) ウィルスのクローニング (clonality) を同定することは不可能であった。更に、男性ホルモン受容体（遺伝子）はCAG繰り返し領域を有しており、β-アドレナリン作用性受容体は80% GCリッチな領域を有しており、またCMVゲノムは75% GCより高い領域を有しているので、これらの核酸はどれも従来のPCR法によっては増幅され得ない。

我々は、GCリッチな核酸配列についてPCRに基づく方法を用いることに伴う上記の問題を解決した。我々の方法を用いることにより、我々は正常個体、キャリア個体および患者個体において、FMR-I遺伝子のGCリッチ領域を増幅し、検出した。

##### 【発明の概要】

本発明は、被検サンプルに存在する選択されたGCリッチな核酸配列を増幅した。本発明の一実施例においては、dGTPが7-デアザdGTPに置換された。

本発明は、脆弱X症候群のキャリアやその患者に特徴的なGCリッチな核酸配列の分析に用いることができる。

##### 【図面の簡単な説明】

図1は、3つの異なる割合の7-デアザdGTPおよびdGTPの存在下で合成されたPCR産物を、電気泳動とサザーン・プロット・ハイブリダイゼーションにより解析したオートラジオグラムの写真である。

図2は、脆弱X陽性の孫息子を含む家族の幾人かに由来するPCR産物を、電気泳動とサザーン・プロット・ハイブリダイゼーションにより解析した二つのオートラジオグラムの写真である。夫々の写真と共に、テストされた何人かのメンバーにおける親族関係を示すチャートが示されている。

図3は、脆弱X陽性の孫および陰性の孫を含む別の家族の何人かに由来するPCR産物を、電気泳動とサザーン・プロット・ハイブリダイゼーションにより解析したオートラジオグラムの写真である。

##### 【発明の詳細な説明】

米国特許第4,683,202号、第4,683,195号、第4,800,159号および第4,965,188号（これらは参考として本明細書中に組み込まれる）には、本発明による改良の対象とされたPCR法が更に詳しく記載されている。

二以上（好ましくは三組）のデオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチドからなるようなオリゴヌクレオチドが、本発明の実施に有用である。オリゴヌクレオチドのサイズおよび配列により、その機能または使用が決まる。オリゴヌクレオチドは合成またはクローニングにより得られる。

本発明において有用なプライマーには、DNA合成またはRNA合成の開始点として作用することができるオリゴヌクレオチドが含まれる。プライマーは、従来法による制限酵素消化分解産物から精製されてもよく、または合成的に製造されても良い。

典型的なPCRでは、選択された核酸のテンプレートと結合する二つのプライマーが採用される。該プライマーは、プライマーの伸長を誘発する条件下において、適切な温度で他のPCR試薬、即ち、4つの異なるヌクレオシド三磷酸（またはその類似物）、適切なポリメラーゼ、および適切な緩衝液（緩衝液にはpH、イオン強度、コファクタ等が含まれる）と組み合わされる。ポリメラーゼがTaqポリメラーゼであるPCR法において、緩衝液は1.5-2mMのマグネシウム塩（好ましくはMgCl<sub>2</sub>）、150-200μMの各ヌクレオシド三磷酸（またはその類似物）、1μMの各プライマー、

好ましくは 50 mM の KCl、10 mM の Tris 緩衝液 (pH 8.4)、および 100 μg/ml のゼラチンを含むのが好ましい。

プライマーは、最大効率で増幅を行うために一本鎖が好ましいが、二本鎖でもよい。二本鎖プライマーは、まず「変性」される。即ち、伸長生成物の調製に使用される前に、その鎖二本を分離するための処理が施される。二本鎖核酸を変性させる好ましい手段は、加熱によるものである。

本発明において、該プライマーは、適切なポリメラーゼおよび他の試薬の存在下において伸長生成物の合成を「プライム(prime)」するために充分に長くなければならない。プライマーの長さは、温度、プライマー供給源および該方法の使用の仕方等の多くの因子に依存する。本発明の実施において、プライマーは 15~25、またはそれ以上のヌクレオチド残基を含むのが典型的である。一般に、短いプライマー分子は、鎖伸長反応を維持するプライマー・テンプレート複合物を形成し且つ維持するために、より低い反応温度を必要とする。

本発明において使用されるプライマーは、増幅すべきものとして選択された配列を含む核酸に対して実質的に相補性である。即ち、プライマーは選択された配列（若しくはその相補物）を含む核酸に結合し、又はこれとハイブリダイズしなければならない。しかし、プライマー配列はそのテンプレートに対して完全に相補的である必要はない。例えば、相補的でないヌクレオチド断片がプライマーの 5' 末端に付いていてもよく、この場合にもプライマー配列の残部は選択された

配列を含む核酸に対して相補的である。或いは、プライマー配列が選択された配列を含む核酸配列に対して、(i) 該核酸とハイブリダイズし且つ (ii) 鎮伸長反応を維持するために充分に相補的であるならば、一以上の非相補的塩基がプライマーに散在していてもよい。上記の事情にかかわらず、最良の結果を得るためにには、選択された配列を含む核酸配列に対して完全に相補的であるプライマーが好ましい。

如何なる核酸配列であっても、本発明の方法によって製造することができる。唯一必要なことは、当該配列の両末端における充分な数の塩基についての詳細が充分に知られていることであり、その結果、別々の鎖の所望の配列に対して当該配列に沿った間接部位でハイブリダイズする二つのオリゴヌクレオチド・プライマーを調製できることである。即ち、一方のプライマーから合成された伸長生成物が、テンプレート（相補物）から分離されたときに、他方のプライマーを伸長して規定の長さの核酸とするための伸長用テンプレートとして働くことができ二つのプライマーを調製できるように、当該配列の両末端における充分な数の塩基についての詳細が知られていることである。

配列の両末端における塩基についての知見が多ければ多いほど、目的とする核酸配列に対するプライマーの特異性が大きくなり、当該方法の効率も向上する。

本発明の好ましい態様では、二つのプライマーが使用される。これら二つのプライマーの一方は、(i) 選択された配列の 3' 末端における配列、(ii) 選択された配列の 3' 末

端に隣接するか又はその近傍にある配列、または (iii) 選択された配列の 3' 末端における配列および選択された配列の 3' 末端に隣接する配列を含む配列の何れかに対して相補的である。この好ましい本態様において、他方のプライマーは、(i) 選択された配列の 5' 末端における配列、(ii) 選択された配列の 5' 末端に隣接するか又はその近傍にある配列、または (iii) 選択された配列の 5' 末端における配列及び選択された配列の 5' 末端に隣接する配列の何れかを含む。或いは、何れかのプライマーは、上述の好ましいプライマーの何れかの相補物に結合し、又はこれとハイブリダイズするプライマーによって置換されてもよい。

「制限エンドヌクレアーゼ」および「制限酵素」の用語は、二本鎖 DNA を特異的なヌクレオチド配列で又はその近傍で切断する、通常はバクテリア由来の酵素を言う。

「熱安定性酵素」の用語は、熱に対して安定かつ耐性であり、テンプレートに対して相補的なプライマー伸長生成物の形成を触媒するポリメラーゼを言う。一般に、合成は各プライマーの 3' 末端で開始され、合成が終了するまでテンプレートの鎖に沿って 5' から 3' 方向へ進行する。理論的には、この方法は、異なる長さの DNA 複製物または RNA 複製物を生成する。上記の方法を使用することにより 5' 末端で合成を開始し、他の方向へ合成を進行させるよう、本発明に有用な熱安定性酵素が存在し得る。

ここで述べる熱安定性酵素が本発明の増幅反応に有効であるためには、一つの基準を満足させなければならない。即ち、

該酵素は、二本鎖の核酸を変性させるために必要な所定時間の温度上昇に曝されたときに、不可逆的な変性（失活）を起こしてはならない。

ここで述べる目的において、不可逆的変性とは酵素活性の永久的且つ完全な喪失を言う。変性に必要な加熱条件は、例えば緩衝液の塩濃度、並びに変性すべき核酸の長さおよびヌクレオチド組成等に依存する。典型的には、温度は約 90°C から約 105°C の範囲であり、時間は主に温度と核酸の長さに依存し、典型的には約 1/2 分から 4 分である。緩衝液の塩濃度および/または核酸の GC 成分が増大するに伴って、より高温に耐え得るようになる。好ましくは、酵素は約 90~約 100°C の温度でも不可逆的に変性しない。

ここで熱安定性酵素は、約 40°C よりも高い至適温度（酵素が作用する温度）を有するのが好ましい。この約 40°C の温度は、それより低い温度ではプライマーのテンプレートへのハイブリダイゼーションが促進される温度である。しかし、より高い温度（たとえば 45~70°C）においても、(1) 緩衝液中のマグネシウムおよび他の塩類の濃度、および (2) プライマーの成分および長さに依存しはするが、ハイブリダイゼーションは起こり得る。酵素の至適温度が高くなるほど、プライマー先導による伸長はより特異的および/または選択性になる。しかし、40°C より低い温度（たとえば 37°C）で活性である酵素もまた、本発明の範疇にある。至適温度範囲は、好ましくは約 50 から 80°C であり、より好ましくは約 60°C 以上である。

## 特表平7-506245 (B)

イブリダイズするオリゴヌクレオチドを合成できるほど充分に詳細に知られており、また (b) 連鎖反応を開始するための少量の前記配列が入手可能であることを条件とする。

この連鎖反応の生成物は、使用したプライマー末端に対応する終端を持った個別の核酸二重鎖となる。

精製または未精製状態の何れの核酸も、開始原料として利用され得る。しかしながら、もしサンプルが選択された配列を欠いている場合には、この方法は如何なる配列も増幅することはない。こうして、本発明の方法では、例えばメッセンジャー RNA を含む DNA または RNA を使用することができ、その DNA または RNA は一本鎖または二本鎖であってもよい。更に、DNA および RNA の夫々の一本鎖を含む DNA - RNA ハイブリッドを使用してもよい。これら核酸の何れの混合物も使用され得るし、或いは同一もしくは異なるプライマーを用いて上記増幅反応で予め製造された核酸も使用され得る。増幅すべき選択された核酸配列は、大きな分子の単なる一部分であってもよく、また選択された配列が核酸全体を構成するような独立した分子として最初から存在していても良い。

選択された配列は精製物である必要はなく、ヒトゲノム DNA に含まれる FMR - 1 連伝子の一部のように、複合混合物のマイナー画分であってもよい。出発核酸は、同一もしくは異なる二つ以上の選択された核酸配列を含んでいてもよい。従って、本発明の方法は、一つの特定の核酸配列を大量に生産するためだけでなく、同一または異なる核酸分子上に位置

耐熱性であるとして文献に報告されている酵素の例には、熱安定性バクテリアであるテルムス・ラブス (*Thermus latus*)、テルムス・ルーバー (*Thermus ruber*)、テルムス・テルモフィリス (*Thermus thermophilus*)、バチルス・ステアロテルモフィリス (*Bacillus stearothermophilus* : これは他の掲載物より幾分低い至適温度を有する)、テルムス・アクアチクス (*Thermus aquaticus*)、テルムス・ラクテウス (*Thermus lacteus*)、テルムス・ルーベンス (*Thermus rubens*) およびメタノテルムス・フェルビドゥス (*Methanothermus fervidus*) 等から抽出されたポリメラーゼのような熱安定性ポリメラーゼが含まれる。

他の有用なポリメラーゼ類は、熱変性以外の方法によって DNA を変性させ、次いでプライマーとアニールさせるような繰り返しサイクルに耐え得るポリメラーゼ類である。しかし、各サイクルで追加の酵素を添加する場合には、不安定なポリメラーゼ類を用いることができる。

本発明は、選択された核酸配列を増幅する方法に向けられている。選択された配列が本方法によって大量に生成されるので、本発明は DNA またはメッセンジャー RNA のクローニング効率を高めるために用いることができ、また選択された配列を増幅して選択された配列の検出を容易にするために用いることができる。

一般に、本発明の方法は、少なくとも一つの核酸配列を、反応ステップの数に関して指数関数的量で製造する連鎖反応を含む。但し、(a) 選択された配列の末端が、該末端とハ

する二つ以上の選択された核酸配列を同時に増幅するためにも有用である。核酸または核酸類は何れの供給源から得てもよい。例えば、プラスミドから、クローンされた DNA もしくは RNA から、または天然 DNA もしくは天然 RNA (バクテリア、酵母、ウイルス、オルガネラおよび植物もしくは動物等の高等生物を含む何れの供給源由来のものをも含む) から得られる。DNA または RNA は、Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982), 280 - 281 に記載されているような種々の技術によって、血液、絨毛性柔突起または羊膜細胞等の組織材料のような何れの核酸含有サンプルからでも抽出することができる。

増幅物を検出するために配列特異的なプローブを使用する方法については、細胞を、核酸の精製をせずに直接使用しても良い。例えば、細胞サンプルを低振幅衝液中に懸濁し、細胞が溶解して細胞内構成物の分散が起こるまで、約 90 °C ~ 100 °C に加熱すればよい。このような工程は、通常は約 1 分 ~ 1.5 分かかる。この加熱工程の後、増幅試薬を溶解した細胞に直接添加すればよい。

核酸が二本鎖を含むならば、これをテンプレートとして使用する前に、該核酸の鎖を分離する必要がある。この鎖の分離は、物理的、化学的または酵素学的手段を含む何れかの適切な変性方法によってなされる。核酸の鎖を分離する好ましい物理的方法の一つは、核酸が完全に (> 99%) 変性されるまで加熱することである。典型的な加熱変性は、約 90 °C ~ 105 °C の範囲の温度で、通常は 0.5 分 ~ 5 分の範囲で

数回行なわれる。好ましくは、効果的な変性温度は約 90 ~ 100 °C で、約 0.5 ~ 3 分間である。鎖の分離はまた、ヘリカーゼ類として知られているクラスの酵素類によって、またはヘリカーゼ活性を有し且つ ATP の存在下で DNA を変性することが知られている酵素 RecA によって誘発されてもよい。ヘリカーゼによる核酸鎖の分離に適する反応条件は、Kubo, Hoffmann-Berling, CSH-Quantitative Biology, 43:63 (1978) に記載されており、RecA を使用する技術は、C. Radde, Ann. Rev. Genetics, 16:405-37 (1982) に概説されている。この変性によって、同じか又は異なる長さの二つの分離された相補的な鎖が生成される。

二本鎖核酸が熱によって変性されたならば、反応混合液は、存在する各プライマーとこれに相補的なターゲット (テンプレート) 配列とのハイブリダイゼーションが促進される温度まで冷却される。この温度は、試薬に応じて通常は約 35 °C ~ 約 65 °C またはそれ以上、好ましくは約 37 °C ~ 約 60 °C であり、二本鎖核酸を変性するに有効な時間だけ (通常は約 0.5 分 ~ 5 分間、好ましくは約 1 分 ~ 3 分間) 保持される。実用的には、温度は約 95 °C から約 65 °C 若しくは約 37 °C の低温 (T<sub>aq</sub> ポリメラーゼの場合、好ましくは約 45 °C ~ 58 °C) にまで単純に低下され、この範囲の温度でハイブリダイゼーションが生じる。

核酸が一本鎖または二本鎖の何れである場合にも、熱安定性酵素は、変性工程か、または温度がハイブリダイゼーションを促進する温度まで下げられたとき、若しくはその温度範

特表平7-506245 (7)

び核酸の長さに主に依存して、典型的には約30秒から4分の範囲である。

上記の時間が経過した後、温度は、先の工程で生成した相補的な一本鎖分子（テンプレート）とプライマーとのハイブリダイゼーションが促進される温度まで下げられる。この温度は上記に記載した通りである。

該ハイブリダイゼーション工程の後、または該ハイブリダイゼーション工程の代わりに（または同時に）、温度は、熱安定性酵素の活性を促進し、前工程で新規に合成された鎖をテンプレートに用いてプライマー伸長生成物の合成が可能になる温度に調整される。このときの温度もまた、既述したように、テンプレートから伸長生成物を分離する（変性する）ほど高くてはならない。通常は約40°C～80°Cで約0.5から40分、好ましくは約50°C～70°Cで約1～3分である。この工程の間にハイブリダイゼーションが起こり得るので、変性に先立つ前工程の冷却は必要とされない。同時工程を用いる場合には、好ましい温度範囲は約50°C～70°Cである。

鎖を分離する加熱および冷却工程、ハイブリダイゼーション工程、並びに伸長生成物の合成工程は、最終用途に応じて、所望量の待定の核酸配列を生成するために必要な頻度で繰り返すことができる。唯一の制限は、存在しているプライマー、熱安定性酵素およびヌクレオシド三磷酸の量である。上記工程は、少なくとも一回は繰り返されるのが好ましい。検出に使用するためのサイクル回数は、例えばサンプルの性質に依

図内にあるときに添加される。次に、反応混合液は酵素活性が促進されまたは至適化される温度、即ち、ハイブリダイズされるプライマー及びテンプレートからプライマー伸長生成物の合成を促進する酵素活性が増大されるに十分な温度にまで加熱される。この温度は、夫々の核酸テンプレートに対して相補的なプライマーの伸長生成物を合成するために現実に十分でなければならないが、各伸長生成物をその相補的テンプレートから変性させる程高くてはならない（即ち、この温度は一般的には約80°C～90°Cよりも低い）。

使用した酵素および核酸の種類に主に依存して、この合成反応に効果的な典型的温度は、一般に約40°C～80°C、好ましくは約50°C～75°Cの範囲である。テルムス・アクアチクス (*Thermus aquaticus*) 由来のポリメラーゼを用いる場合は、約65°C～75°Cに亘る範囲がより好ましい。この合成に必要な時間は、主に温度、核酸の長さ、酵素および核酸混合物の複合度に応じて約0.5分～40分の範囲であり、好ましくは約1分～3分である。核酸が長くなると、一般的にはより長い時間が必要である。

新規に合成された核酸鎖およびこれに対して相補的な核酸鎖は二本鎖分子を形成し、本方法の次の工程で使用される。次の工程において、この二本鎖分子の鎖は、分子を変性するには有効であるが熱安定性酵素が完全な不可逆的変性で不活性化されるほどには高くてはならない温度で、熱変性により分離される。主に酵素の種類および核酸の長さ応じて、該温度は一般に約90から100°Cの範囲である。変性時間は、温度およ

び10%のDMSOを添加して行われる。該反応には夫々 320 μM の dATP、dCTP、およびdTTP が含まれるが、dTTP の代わりに 320 μM の 7-デアザ・2'-dTTP を使用するように改変された。

以下の実施例では、脆弱 X症候群に罹患した個体、該症状についてプレミューテーションの状態にある男性キャリアおよび女性キャリア、並びに対照の5個体において、本発明を使用して増幅されたGCリッチな配列の存在を検出することに言及する。

これらの実施例で使用されているGTP類縁体は、7-デアザ・2'-dTTPである。しかし、これら実施例で採用した条件下において7-デアザ・2'-dTTPをdTTPで希釈すると、高分子量の種は検出されなかった（図1）。従って、PCR反応混合物は実質的にGTPおよびdTTPを含まないのが好ましい。

本発明のもう一つの態様では、DMSOおよびグリセロールのような、GCリッチな核酸の複型および転写を高める別の成分が構成物が用いられる。

従来のクローニングおよび発現手法は、本発明のPCR法を採用するために適用することができる。例えば、GCリッチな以上の選択された核酸配列をクローニングするための従来の方法において、実質的にGTPおよびdTTPを含まないが、GTPまたはdTTPの類縁体を含むPCR法を使用することによって、クローニングの前にDNA量を増幅することができる。このような方法は、（1）増幅された核酸

存する。サンプルが核酸の複合混合物であり、全核酸が一定に保持されているならば、検出に十分なシグナル増幅を得るためにより多くのサイクルが必要となるであろう。一般的な増幅および検出には、少なくとも約20回だけ工程を繰り返すことが好ましい。

本発明の方法においては、グアノシンヌクレオチド類縁体が使用される。米国特許第4,804,748号には、本発明に有用な上記類縁体が開示されており、この開示は参考として本明細書に組み込まれる。該好ましい類縁体は、イノシン、7-デアザ・グアノシンおよび7-デアザ・イノシンのヌクレオチド（リボおよびデオキシリボの両方を含む）である。2'-デオキシ類縁体がより好ましく、7-デアザ・2'-デオキシグアノシン（7-デアザ・2'-dTTP）類縁体が更に好ましい。

グアノシン類縁体を使用することに加えて、本発明の方法は、GTPおよびdTTPを実質的に含まない反応混合物中で行われるのが更に好ましい。

好ましい態様では、ポリメリゼーションまたは鎖伸長反応は標準PCR緩衝液、即ち、50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl緩衝液pH 8.3、15 mM MgCl<sub>2</sub>、および0.001% (W/V) のゼラチンを含む緩衝液 (Saiki, Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermotolerant DNA Polymerase, *Science* 239: 487-91 (1988)) 中において、0.5～1 μg の変性ゲノムDNA、50 pmol の各オリゴヌクレオチドプライマー、2.5単位のTagポリメラーゼおよ

生成物に対して、選択されたDNA配列を含む切断物を得るのに効果的な仕方で制限酵素を添加すること；(ii)選択されたDNA配列を含むこの切断物を、組換分子を作成するのに効果的な仕方でライゲートすること；(iii)このような切断物を精製、脱塩および／または濃縮すること；(iv)選択されたDNA配列を含む該組換分子の配列を決定すること；(v)この特定の核酸配列によってコードされる蛋白を発現させること；および(vi)このような切断物を、特異的な配向で新しい核酸にライゲートすることを包含することになるであろう。

脆弱X症候群に罹患している数人の個体および彼等の家族構成員の何人かを、我々の改良PCR分析を使用して分析した。幾つかのケースにおいて、罹患個体および彼等の家族構成員から得た末梢血液リンパ球または培養羊膜細胞から、ゲノムDNAが単離された。他のサンプルは、羊水から培養なしで直接、または未精製細胞培養物からDNA抽出なしで直接得られた。ゲノムDNAの単離方法は、参考として本明細書に組み込まれる Kratke, Analysis of Human Y Chromosome Specific Repeated DNA in Chromosome Variants, Proc. Natl. Acad. Sci. 74: 1245-49 (1977) に詳細に記載されている。

刊行物に記載のFMR-I・cDNA配列 (Verkerk, et al., 1991) の一部分に対して特異的なオリゴデオキシリボヌクレオチドのプライマーが、バイオサーチ／ミリゲン・モデル 8700 DNA合成機上において、シアノエチルホスフォロ

アミダイトの化学により合成され、HPLCにより精製された。センスプライマーの配列は、5'-GACGGAGGC GCCCGTGCCAGG-3' (FMR-I・cDNA配列のヌクレオチド番号1~21に対応する) であり、アンチセンスプライマーの配列は、5'-TCCTCCATCTT CTCTTCAGCCCT-3' (FMR-I・cDNA配列のヌクレオチド番号203~181に対応する) であった。刊行物に記載の配列 (Verkerk, et al., 1991) および我々のプライマー選択に基づいて、增幅生成物は長さが203 bp であり、また90 bp のCGGリッチ領域を含んでいることが推定された。Verkerkの文献は、参考文献として本明細書中に組み込まれる。

PCRの増幅は、標準PCR緩衝液中 (50 mMのKCl、1.0 mMのTris-HCl、pH 8.3、1.5 mMのMgCl<sub>2</sub>、および0.001% (W/V) のゼラチン) 中において、0.5~1 μg の変性ゲノムDNA、50 pmolの各オリゴヌクレオチドプライマー、2.5単位のTaqポリメラーゼおよび10%のDMSOを添加して行われた。この反応には各々320 μMのdATP、dCTPおよびdTTPを含んでいたが、dGTPの変わりに320 μMの7-デアザ-2'-dGTPを使用するように改変された。この改変ヌクレオチドの使用によって、一般のプライマーにより生成される特定のPCR生成物の量が著しく増大され、従来法では不可能とされていた罹患個体に存在する非常に大きな対立遺伝子の増幅および検出が可能になった。この反応液に

対して、97°Cで30秒の変性、55°Cで60秒のアニーリング、および72°Cで60秒の伸長からなる40サイクルが施された。

各反応のアリコットをアガロースゲル電気泳動で分析した。PCR生成物はエチジウム・プロマイド染色で直接可視化することができないので、これら生成物の可視化を増長するために、サザンプロット分析を用いた。DNAをナイロン膜に移した。この膜を、0.9 M 塩化ナトリウム、0.09 M クエン酸ナトリウム溶液 (「6X・SSC」) 、5X Denhard I の溶液、0.5% SDS (ドデシル硫酸ナトリウム) および1000 μg/mLの変性キャリアDNA中において42°Cで予備ハイブリダイズした (Maxam: et al., 参照)。ハイブリダイゼーションは、T4ポリヌクレオチド・キナーゼを用い、ガンマ<sup>32</sup>P-ATPで予め放射線活性標識したオリゴデオキシリボヌクレオチド・プローブを添加して行った。一晩ハイブリダイゼーションした後に、フィルターを6XSSC、0.5% SDS中において室温で15分洗浄し、次いで2XSSC、0.5% SDS中において56°Cで30分洗浄した後、オートラジオグラフィーにかけた。一方のオリゴヌクレオチド・プローブ (A) は、FMR-I・cDNAの127~151のヌクレオチド (5'-CTGGGCCCTCGAG CGCCCGCAGCCCA-3') に対応し、他方の (B) は、ヌクレオチド37~126に対応するCGG繰り返し領域 (5'-[CGG]<sub>n</sub>-3') と相同であった。

#### 実施例1

(1) 正常個人 (レーン1) ; (2) 脆弱X保持者男性 (レーン2) ; (3) 脆弱X症候群罹患男性 (レーン3) ; および (4) 女性脆弱X保持者 (レーン4) から単離された夫々のDNAを、7-デアザ-2'-dGTP: dGTPの異なる比率 (100:0; 75:25; 50:50) の下でPCRに供した。PCR生成物を、FMR-I 遺伝子座のCGG繰り返し領域に対して相補的な上記プローブBを用いて、プロットハイブリダイゼーションにより分析した。図1はこの分析の結果を示している。高分子量のバンドは、100%の7-デアザ-2'-dGTPおよび0%のdGTPの存在下でのみ検出された。即ち、完全に突然変異した脆弱X遺伝子は、PCR反応混合液が実質的にdGTPを含まないときにのみ検出された。

#### 実施例2

脆弱X家族N43からDNAサンプルを採取し、上記に述べたようにしてPCR、電気泳動、ハイブリダイゼーションに供した。これらの分析の結果は図2に示されている (プローブAの結果は上部にあり、プローブBの結果は下部にある)。露出時間は、夫々16時間および4時間であった。レーン(-)は、DNA無しの対照 (プライマーのみ) ; レーン(C)はランダム対照の女性DNAサンプルである。DNAサイズマーカー (bpで) は左側に示されている。200 bpの断片のみが非キャリアの配偶者、即ち罹患個体の父および祖母由来のDNA中には検出された。約400 bpのPCR生成物が、表現型上は正常キャリアである祖父に検出さ

特表平7-506245 (8)

れた。該配列は、サイズが明らかに大きくなつて彼の娘に遺伝していた。脆弱X陽性の孫は約640 bpのPCR生成物を示し、この領域が著しく増大していることを示した。

プローブA(図2A)およびプローブB(図2B)による系列的ハイブリダイゼーションでは、同様なパターンが示された。しかしながら、変異配列はBプローブを用いたときに、より容易に検出された。このことは、変異がCGG配列の増幅を包含しており、従つてCGGプローブ(プローブB)に對して相同なPCR生成物の配列量を増加させることを示唆している。

実施例3

図3は、本発明の方法を使用して、プローブBのみによる第二家族(脆弱X族N6)の分析を行つた結果を示している。DNAマーカーによれば、この家族において、祖父は最大の可能性でキャリアであるらしいこと、また彼の娘たちは両方ともキャリアであると分かることが示された。この分析は、プローブBのみを使用した点を除き、実施例2に記載したのと同様にして行われた。露出時間は3時間であった。キャリアである祖父は、約400 bpのバンドに見られる彼の増幅領域を、キャリアである彼の娘の両方に遺伝させた。娘二人は、同様の複雑な増幅パターンを示した。即ち、両者共に、正常な200 bpバンドに加えて、約400、530および650 bpのバンドを保持していた。

一人の娘には、200 bpの正常バンドを有する罹患していない一人の息子がいた。二番目の妊娠は細胞遺伝学的に陽

性的男性胎児であり、この妊娠は中絶された。この胎児から得たDNA検体には正常バンドがなかったが、400 bp～約500 bpの異種スメアを包含していた。

もう一人の娘には、200 bpのバンド及び微かな約400 bpのバンドを有する細胞遺伝学的に陽性の罹患した娘がいた。彼女の罹患した息子は、約1000 bpの増幅バンドを示した。この息子、彼の兄弟および両親についても、以前にも、プローブO x 1.9を用いたゲノムサザンプロット分析、および細胞遺伝学によって研究されている (Imai, S; Figure 5d; Nakabayashi et al., Molecular Heterogeneity of the Fragile X syndrome, Nucl. Acids. Res. 19 4355-59, 1991)。この罹患した息子には興味がもたれる。何故なら、彼は幾つかの場合に細胞遺伝学的に陰性であったからである。後者の研究において、キャリアである母親は異常なDNAパターンを示さなかった。しかるに、我々の研究では、明らかに変異したバンドの存在が示された。我々の研究では、罹患した娘はその母親と同様のパターンを示したが、変異対立遺伝子の強度は弱かった。

我々は、34の脆弱X家族から選択された、38人の罹患男性、12人のキャリア男性および60人の罹患および不罹患のキャリア女性の研究においても同様な結果を首尾一貫して観察してきた。全ての罹患男性が、プローブBを用いたときに、最高6 kbの長さの大きなバンドおよび/またはスメアを示した。

これらの結果は、我々の改変PCRを使用して、脆弱X突

然変異の存在および性質についての情報を速やかに提供することができることを示している。このようなアプローチによって、FMR-1遺伝子座における変異を迅速に解明することができるであろう。罹患した脆弱X個体の全員がキャリアである母親をもつと思われるので (Brown, 1990)、全てのキャリアを検出するためにPCRに基づく方法を用いたスクリーニングテストを企画することが適切である。キャリアの妊娠は監視することができるから、脆弱X症候群の危険性は大きく減少するかまたは併存される。

実施例4

エプスタイン・バールウイルス感染を有すると思われる個体から、末梢血液サンプルを採取する。エプスタイン・バール核酸配列のGCリッチな末端繰り返し領域に対するプライマーを、他のPCR試薬と共に添加する。次に、その結果を標準と比較し、当該サンプルを提供した個体における感染のクローニング性を決定する。

要約すると、本発明はPCR分析を改良し、この方法をGCリッチな核酸配列への適用にまで拡大する。これによって、脆弱X症候群に存在する高分子GCリッチ配列のPCR法による検出が初めて可能になる。この方法は、当初に少量でのみ存在している核酸配列の検出において、また配列特異的オリゴヌクレオチドを用いたヌクレオチド変異の検出において特に有用である。また、ここに述べた増幅工程は、分子クローニングおよび配列決定にも使用できる。本発明の方法によれば、以前に開示されている方法を凌ぐ高い収量、高い

特異性がもたらされ、また少ない工程で増幅法を実施することが可能となる。本発明による方法の従来技術を凌ぐ利点は、時間と組織培養の費用を必要とせずに、患者のサンプルを分析できることである。

分子生物学および関連専門分野の当業者に自明であるよう、本発明の上記態様に関する他の改良も、後述する特許請求の範囲に含まれるものである。

## 記 列 表

## (i) 一般情報

(i) 出願人: Pergolizzi, R. G.  
Broter, S. B.  
Brown, W. T.

(ii) 発明の名称: G C- リッタDNA配列の増幅、検出及びクローニング方法

(iii) 配列の数: 4

## (iv) 通信宛先:

(A) 先先: Stuart J. Slatkin, Keayton & Keayton  
(B) 街: One Broadway  
(C) 市: New York  
(D) 州: New York  
(E) ZIP: 10004

## (v) コンピュータ統取可能形態:

(A) メディアタイプ: フロッピーディスク  
(B) コンピュータ: IBM PC互換機  
(C) オペレーティング・システム: PC-DOS/MS-DOS  
(D) ソフトウェア: Patentscope Release 01.0, Version 01.25

## (vi) 本願のデータ:

(A) 出願番号: 米国、未決定  
(B) 出願日: 1992年1月28日

## (vii) 直接の起源:

(B) クローン名: FMR-1

## (viii) ゲノム内での位置:

(A) 染色体/セグメント名: X  
(B) 染色体上の位置: 1 - 21

## (ix) 刊行物の情報

(A) 著者: Verkerk, A. JMB  
(B) 名称: Identification of a Gene (FMR-1) Containing a CGG Repeat Colincident with a Breakpoint Cluster Region Exhibiting Length Variation in Fragile X Syndrome  
(C) ジャーナル: Cell  
(D) 巻: 65  
(E) 頁: 905 - 914  
(F) 日付: 1991  
(G) 配列番号1における間連残基: 1から

## (h) 配列: 配列番号1

15 GACGGAGGCG CCCGTGCCAG G  
23

## (i) 配列番号2の情報

## (ii) 配列の特徴

(A) 長さ: 23塩基対  
(B) 型: 仮想  
(C) 緒の数: 一本鎖  
(D) トポロジー: 不明

## (i) 分類:

(iii) アトニー-/エージェントの情報:  
(A) 名称: Scott, Walter  
(B) 登録番号: 30,588  
(C) 参照/事件番号: 52494-9

## (iv) 連絡情報:

(A) 電話: (212) 425-7200  
(B) テレファックス: (212) 425-5288

## (v) 配列番号1の情報

## (i) 配列の特徴

(A) 長さ: 21塩基対  
(B) 型: 仮想  
(C) 緒の数: 一本鎖  
(D) トポロジー: 不明

## (ii) 配列の種類: DNA (ゲノム)

(iii) ハイポセティカル配列: NO

(iv) アンチセンス: NO

## (v) 起源:

(A) 生物名: ホモ・サピエンス  
(B) 細胞の種類: 血液および羊水細胞  
(C) 細胞の種類: リンパ球

## (i) 配列の種類: DNA (ゲノム)

(ii) ハイポセティカル配列: NO

(iii) アンチセンス: YES

## (iv) 起源:

(A) 生物名: ホモ・サピエンス  
(B) 細胞の種類: 血液および羊水細胞  
(C) 細胞の種類: リンパ球

## (v) 直接の起源:

(B) クローン名: FMR-1

## (vi) ゲノム内での位置:

(A) 染色体/セグメント名: X  
(B) 染色体上の位置: 181 - 203

## (vii) 刊行物の情報

(A) 著者: Verkerk, A. JMB  
(B) 名称: Identification of a Gene (FMR-1) Containing a CGG Repeat Colincident with a Breakpoint Cluster Region Exhibiting Length Variation in Fragile X Syndrome

(C) ジャーナル: Cell

(D) 巻: 65

(E) 頁: 905 - 914

(F) 日付: 1991

(G) 配列番号2における間連残基: 1から

## (ii) 配列：配列番号2

TCCTCCATCT TCTCTTCAGC CCT  
23

## (2) 配列番号3の情報

## (i) 配列の特徴

- (A) 長さ：25塩基対
- (B) 型：複数
- (C) 繩の数：一本縩
- (D) トポロジー：不明

## (ii) 配列の種類：DNA (ゲノム)

## (iii) ハイポセティカル配列：NO

## (iv) アンチセンス：NO

## (v) 起原：

- (A) 生物名：ホモ・サビエンス
- (B) 脊椎の種類：血液および単水細胞
- (C) 細胞の種類：リンパ球

## (vi) 直接の起原：

- (B) クローン名：FMR-1

## (vii) ゲノム内での位置：

- (A) 染色体/セグメント名：X
- (B) 染色体上の位置：127 - 151

## (i) 刊行物の情報

(A) 著者：Verkerk, A. JMB

(B) 名称：Identification of a Gene (FMR-1) Containing a CGG Repeat Coincident with a Breakpoint Cluster Region Exhibiting Length Variation in Fragile X Syndrome

(C) ジャーナル：Cell

(D) 巻：65

(E) 頁：905 - 914

(F) 日付：1991

(G) 配列番号3における間連残基：1から

## (ii) 配列：配列番号3

CTGGGGCTCG AGGGCCCCCA GCCCA  
25

## (2) 配列番号4の情報

## (i) 配列の特徴

- (A) 長さ：30塩基対
- (B) 型：複数
- (C) 繩の数：一本縩
- (D) トポロジー：不明

## (ii) 配列の種類：DNA (ゲノム)

## (iii) ハイポセティカル配列：NO

## (iv) アンチセンス：NO

## (v) 起原：

(A) 生物名：ホモ・サビエンス

(B) 脊椎の種類：血液および単水細胞

(C) 細胞の種類：リンパ球

(vi) 直接の起原：

(B) クローン名：FMR-1

(vii) ゲノム内での位置：

(A) 染色体/セグメント名：X

(B) 染色体上の位置：37 - 126

## (i) 刊行物の情報

(A) 著者：Verkerk, A. JMB

(B) 名称：Identification of a Gene (FMR-1) Containing a CGG Repeat Coincident with a Breakpoint Cluster Region Exhibiting Length Variation in Fragile X Syndrome

(C) ジャーナル：Cell

(D) 巻：65

(E) 頁：905 - 914

(F) 日付：1991

(G) 配列番号4における間連残基：1から

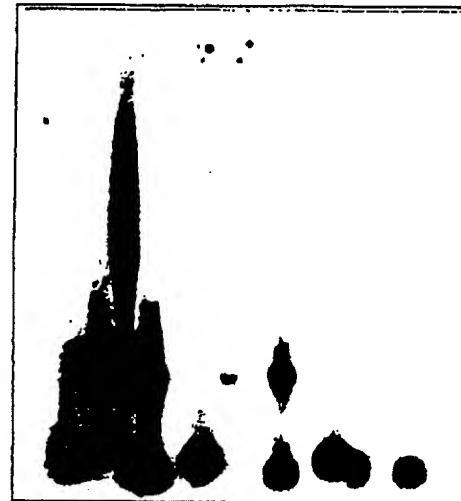
## (ii) 配列：配列番号4

CGGGGGGGCG GGGGGGGGGG GGGGGGGGGG GGGGGGGGGG  
GCGGGCGGGCG 60

CGGGGGGGCG GGGGGGGGGG GGGGGGGGGG

90

FIG. 1



1 = 正常者 ♂ 1 2 3 4 1 2 3 4 1 2 3 4  
2 = 突然変異前 ♂ 100% 75% デアザ 50% デアザ  
3 = 患者 ♂ 25% dGTP 75% デアザ 50% dGTP  
4 = キャリア ♀ デアザ

FIG. 2A

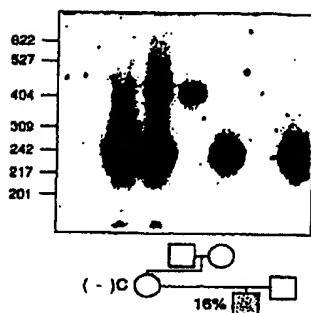


FIG. 2B

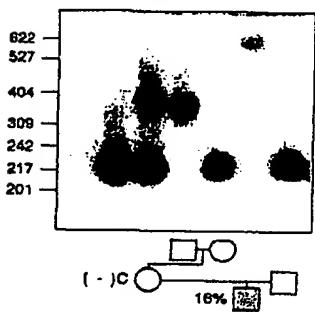
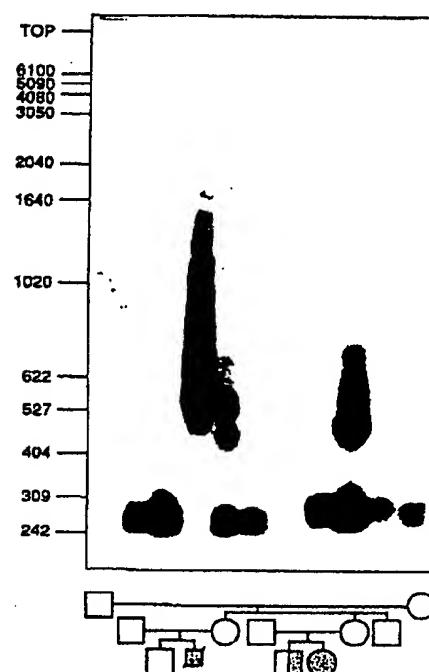


FIG. 3



国際特許申告		International application No. PCT/JP93/03721
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC9: C12Q 1/04 US CL: 435/6		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classifications and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum document searched (classification system followed by classification symbols)		
U.S. : 435/6, 13/02, J, 25/27		
Document classed other than minimum document searched to the extent that such documents are excluded in the fields searched		
Document classed other than minimum document searched during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
BIOB, CAS REGISTRY, USPAT (APD)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Character of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Science, Volume 251, No. 4989, issued 04 January 1991, Hertz et al, "Isolation of Sequences That Span the Fragile X and Identification of a Fragile X-Related 'CpG Island,'" p. 1236-1239, see entire document.	1-16
Y,P	US, A, 5,091,310 (Inria) 25 February 1992, col. 4 lines 3-21.	1-16
Y	Science, Volume 252, issued 21 June 1991, "Mapping of DNA Instability at the Fragile X to a Triadecotide Repeat Sequence p(CCC)n," p. 1711-14, 1991, see entire document.	9-16
<input type="checkbox"/> Previous documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> One patent family name.		
<input type="checkbox"/> Insertion of copy documents		
<input type="checkbox"/> "A" documents are the original documents of the set which is recommended to be published after the International Publication Date, to prevent disclosure of the invention before the International Publication Date.		
<input type="checkbox"/> "B" documents are the original documents of the set which are recommended to be published after the International Publication Date.		
<input type="checkbox"/> "C" documents published up to or after the International Publication Date, which may draw attention to priority documents or which is recommended to be published after the International Publication Date.		
<input type="checkbox"/> "D" documents published up to or after the International Publication Date, which may draw attention to priority documents or which is recommended to be published after the International Publication Date.		
<input type="checkbox"/> "E" documents which may draw attention to priority documents or which is recommended to be published after the International Publication Date.		
<input type="checkbox"/> "F" documents which may draw attention to priority documents or which is recommended to be published after the International Publication Date.		
<input type="checkbox"/> "G" documents which may draw attention to priority documents or which is recommended to be published after the International Publication Date.		
<input type="checkbox"/> "H" documents which may draw attention to priority documents or which is recommended to be published after the International Publication Date.		
<input type="checkbox"/> "I" documents which may draw attention to priority documents or which is recommended to be published after the International Publication Date.		
<input type="checkbox"/> "J" documents which may draw attention to priority documents or which is recommended to be published after the International Publication Date.		
<input type="checkbox"/> "K" documents which may draw attention to priority documents or which is recommended to be published after the International Publication Date.		
<input type="checkbox"/> "L" documents which may draw attention to priority documents or which is recommended to be published after the International Publication Date.		
<input type="checkbox"/> "M" documents which may draw attention to priority documents or which is recommended to be published after the International Publication Date.		
<input type="checkbox"/> "N" documents which may draw attention to priority documents or which is recommended to be published after the International Publication Date.		
<input type="checkbox"/> "O" documents which may draw attention to priority documents or which is recommended to be published after the International Publication Date.		
<input type="checkbox"/> "P" documents which may draw attention to priority documents or which is recommended to be published after the International Publication Date.		
<input type="checkbox"/> "Q" documents which may draw attention to priority documents or which is recommended to be published after the International Publication Date.		
<input type="checkbox"/> "R" documents which may draw attention to priority documents or which is recommended to be published after the International Publication Date.		
<input type="checkbox"/> "S" documents which may draw attention to priority documents or which is recommended to be published after the International Publication Date.		
<input type="checkbox"/> "T" documents which may draw attention to priority documents or which is recommended to be published after the International Publication Date.		
<input type="checkbox"/> "U" documents which may draw attention to priority documents or which is recommended to be published after the International Publication Date.		
<input type="checkbox"/> "V" documents which may draw attention to priority documents or which is recommended to be published after the International Publication Date.		
<input type="checkbox"/> "W" documents which may draw attention to priority documents or which is recommended to be published after the International Publication Date.		
<input type="checkbox"/> "X" documents which may draw attention to priority documents or which is recommended to be published after the International Publication Date.		
<input type="checkbox"/> "Y" documents which may draw attention to priority documents or which is recommended to be published after the International Publication Date.		
<input type="checkbox"/> "Z" documents which may draw attention to priority documents or which is recommended to be published after the International Publication Date.		
Date of the initial composition of the international search		Date of the international search report
23 MARCH 1992		31 MARCH 1993
Name and mailing address of the ISA/DP Commissioner of Patents and Trademarks Washington, D.C. 20591 Priority No. NOT APPLICABLE		Authorized officer SCOTT HOUTTEMAN Telephone No. (703) 205-0116

フロントページの続き

(72)発明者 ブラウン、テッド・ダブリュ  
アメリカ合衆国、ニューヨーク州 11050、  
ポート・ワシントン、ブランドーム・ロー  
ド 33エヌ